



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ Patentschrift  
⑩ DE 44 08 034 C 1

⑤① Int. Cl.<sup>6</sup>:  
**G 01 N 27/453**  
G 01 N 27/62  
H 01 J 49/02  
C 07 K 1/26

②① Aktenzeichen: P 44 08 034.4-52  
②② Anmeldetag: 10. 3. 94  
④③ Offenlegungstag: —  
④⑤ Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung: 13. 7. 95

DE 44 08 034 C 1

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑦③ Patentinhaber:  
Bruker - Franzen Analytik GmbH, 28359 Bremen, DE

⑦② Erfinder:  
Franzen, Jochen, 28359 Bremen, DE

⑤⑥ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit  
in Betracht gezogene Druckschriften:  
Analytical Chemistry, Bd. 66 (1994), S. 464 ff;  
Analytical Chemistry, Bd. 66 (1994), S. 471 ff;

⑤④ Verfahren zur massenspektrometrischen Analyse von Proben aus 2D-Gel-Elektrophoreseplatten mit  
matrixunterstützter ionisierender Laser-Desorption

⑤⑦ Das Verfahren betrifft die massenspektrometrische Analyse von separierten Substanzproben auf sogenannten 2-D-Gel-Elektrophoreseplatten, wie sie insbesondere für die Proteinbestimmung verwendet werden, mit einer Ionisierung der Substanzproben durch matrix-unterstützte Ionisierung Laser-Desorption (englisch: MALD oder MALDI = matrix assisted laser desorption/ionization). Die Moleküle der Substanzproben werden dazu auf eine dünne, lackartige glatte Matrixschicht übertragen, die auf einem vorzugsweise metallischen Probenträger aufgebracht ist. Die Übertragung geschieht direkt oder indirekt, beispielsweise über eine PVDF-Membran als Zwischenträger, durch elektrophoretischen Transport der Moleküle. Vor der Übertragung können die Proteine einer enzymatischen Zerschneidung ihrer Aminosäureketten unterworfen werden.

DE 44 08 034 C 1

## Umfeld der Erfindung

Das Verfahren betrifft die massenspektrometrische Analyse von separierten Substanzproben auf sogenannten 2-D-Gel-Elektrophoreseplatten, wie sie insbesondere für die Proteinbestimmung verwendet werden, mit einer Ionisierung der Substanzproben durch matrix-unterstützte Ionisierung Laser-Desorption (englisch: MALD oder MALDI = matrix assisted laser desorption/ionization). Die Moleküle der Substanzproben werden dazu auf eine dünne, lackartige glatte Matrixschicht übertragen, die auf einem vorzugsweise metallischen Probenträger aufgebracht ist. Die Übertragung geschieht direkt oder indirekt, beispielsweise über eine PVDF-Membran als Zwischenträger, durch elektrophoretischen Transport der Moleküle. Vor der Übertragung können die Proteine einer enzymatischen Zerschneidung ihrer Aminosäureketten unterworfen werden.

## Stand der Technik

Die zweidimensionale Elektrophorese stellt eine der schnellsten und elegantesten Methoden zur gleichzeitigen Trennung von Hunderten von Proteinen aus biologischen Proteingemischen dar und bietet zudem eine grobe Klassifizierung. In der Monatszeitschrift "Electrophoresis" (Verlag Chemie, Weinheim) werden in jährlichen November-Sonderausgaben (editiert durch J. E. Celis) allein Tausende von menschlichen und tierischen Proteinen, die mit dieser Methode getrennt und grob klassifiziert wurden, in Datenbanken zusammengefaßt. Dabei wird eine grobe Bestimmung des Molekulargewichts der Proteine aufgrund der elektrophoretischen Eigenschaften vorgenommen, die jedoch wegen unbekannter Formfaktoren um einen Faktor 2 falsch sein können. Die Molekulargewichte reichen dabei von 8 bis etwa 160 Kilodalton.

Von den im November 1993 veröffentlichten 3038 Haut-Proteinen waren 763 näher identifiziert, und nur von 176 Proteinen waren Teile der Aminosäure-Sequenz bekannt. Für die früher veröffentlichten Datenbanken gilt ähnliches. Insgesamt schätzt man allein die Anzahl menschlicher Proteine auf 50 000 bis 100 000, etwa ebensoviel, wie es, geschätzt, menschliche Gene gibt.

Es ist seit langem wünschenswert, die Proteine genauer zu bestimmen. Insbesondere würde das "Human Genome Project" leer laufen, wenn es nicht gelänge, die durch die DNA-Ketten erzeugten Eiweiße genau zu bestimmen. Die Bestimmung sollte sich nicht nur auf das genaue Molekulargewicht beziehen, sondern nach Möglichkeit auf die von DNA-Sequenzanalysen unabhängige Bestimmung der vollständigen Aminosäure-Sequenz.

Ein Zwischenschritt in der Bestimmung ist die Feststellung, ob es sich bei einem Protein um ein bereits bekanntes Protein handelt. Dieser Schritt kann heute relativ leicht vollzogen werden. In Datenbanken sind heute etwa 30 000 bis 40 000 Proteine erfaßt, mit ihren Aminosäure-Sequenzen, soweit in Teilen oder ganz bekannt. Außerdem sind dort mehr als 100 000 Proteine gespeichert, deren Aminosäure-Sequenzen rechnerisch aus DNA-Sequenzdaten gewonnen wurden. Existenz oder richtige Struktur dieser Proteine sind aber noch unbekannt.

Ein Beispiel ist die Datenbank des Europäischen Molekular-Biologischen Laboratoriums in Heidelberg (EMBL), die auf Computer-CDs erhältlich ist.

Diese Datenbanken sind teilweise bereits rechnerisch so aufbereitet, daß sie auch die bei enzymatischer Verdauung erwartbaren Bruchstücke enthalten, etwa die Bruchstücke, die sich bei Anwendung von Trypsin bilden. Trypsin zerschneidet die Aminosäuren-Ketten immer an charakteristischen Stellen zwischen zwei bestimmten Aminosäuren.

Die Mischung dieser Trypsin-Bruchstücke ist nun für ein Protein außerordentlich charakteristisch. Schon aus der Kenntnis des Molekulargewichts einiger weniger Bruchstücke läßt sich ein Protein sehr sicher identifizieren. Erst unter  $10^{13}$  Proteinen finden sich zwei voneinander verschiedene Proteine, die fünf verschiedene Trypsin-Bruchstücke mit exakt gleichen Molekulargewichten gemeinsam haben. Bei mehr als fünf bekannten Bruchstücken steigt die Sicherheit der Bestimmung exponentiell an.

Die Verdauung eines unbekannten Proteins mit dem Enzym Trypsin, und eine anschließende Messung der Molekulargewichte der Bruchstücke erlaubt es daher schnell und mit hoher Sicherheit, in der Datenbank zu prüfen, ob das Protein schon in der Datenbank erfaßt ist.

Die Messung der Molekulargewichte kann sehr schnell und einfach mit der Massenspektrometrie erfolgen. Die Methode der matrixunterstützten ionisierenden Laser-Desorption erlaubt heute die gleichzeitige, sehr effektive Ionisierung von Peptiden und Proteinen in Mischungen. Die Ionen können mit Flugzeit-Spektrometern, mit Ionenfallen- oder ICR-Massenspektrometern gemessen werden.

Die Unterstützung der ionisierenden Laser-Desorption großer, organischer Moleküle durch lichtabsorbierende Substanzmatrices, meist organische Säuren oder andere nicht zu große, polare organische Moleküle, ist heute bereits eine weit verbreitete Standardtechnik. Sie wird vorzugsweise für die Flugzeit-Massenspektrometrie verwendet, ist aber auch für ionenspeichernde Massenspektrometer, wie ICR oder Ionenfallen, geeignet.

Beim Beschuß mit einem gepulsten Laser wird durch Aufheizen eines kleinen Volumens der Matrixsubstanz eine Dampf Wolke gebildet, die wegen der leichten Ionisierbarkeit der Moleküle und der relativ hohen Verdampfungstemperatur nach der Saha-Eggert-Gleichung einen geringen Anteil an ionisierten Molekülen enthalten muß, also ein schwaches Plasma darstellt. Die in dem Matrixmaterial eingeschlossenen großen Moleküle, also in unserem Falle die Proteine, werden dabei in schonender Weise mit verdampft. Durch Ionen-Molekül-Reaktionen in diesem Plasma werden dann bevorzugt die schweren Moleküle ionisiert, da deren Ionisierung energetisch günstiger ist.

Die ionisierende Laser-Desorption ist eine besonders günstige Ionisierungsmethode für Flugzeit-Massenspektrometer, da die Ionen der großen Moleküle durch den gepulsten Laser in einem sehr kurzem Zeitintervall gebildet werden, und da sich die Flugzeit-Spektrometer wegen ihres nach oben offenen Massenbereichs besonders gut für die Untersuchung von großen Molekülen eignen. Es werden dabei allgemein Laser mit einer Pulslänge von etwa 5 Nanosekunden benutzt.

Die Methode erforderte bislang eine oberflächlich sehr unregelmäßige Schicht mit einigen größeren Matrixkristallen, in die die Untersuchungssubstanz eingebettet werden mußte. Durch eine neue, in der Patentanmeldung BFA 1/94 beschriebene Methode ist es aber

möglich, eine gleichmäßig dicke, glatte, lackähnliche Matrixschicht zu benutzen, deren Dicke bei zwei bis drei Wellenlängen des verwendeten Laserlichtes liegt, und die es erlaubt, die Analysesubstanzen erst nach Erzeugung dieser Schicht auf die Oberfläche der Matrixschicht aufzutragen.

Das Beladen dieser Matrixschicht mit Substanzmolekülen ist sehr einfach. Eine sehr verdünnte Lösung kann beispielsweise einfach als Lösungstropfen aufpipettiert werden. Eine kurze Einwirkungszeit genügt, um die Substanzmoleküle an die Matrixoberfläche fest zu binden. Die Art dieser Bindung ist noch nicht bekannt, es mag sich um oberflächliche Adsorption, um Absorption in den obersten Schichten der Matrix, oder auch um ein oberflächliches Eindringen in zwischenkristalline Bereiche handeln. Die Bindung ist jedenfalls so fest, daß sich die Substanzmoleküle in nachfolgenden Waschungen der Oberfläche nicht beseitigen lassen.

Diese neue Präparationsmethode zeigt eine ganz exzellent verbesserte Substanzausbeute. Mit nur 50 Attomol eines Proteins, aufgetragen auf einen Fleck von etwa 2 Millimeter Durchmesser, können bereits gut auswertbare Spektren erhalten werden. Damit ist der Substanzverbrauch gegenüber der bisher üblichen Methode um einen Faktor Tausend verringert.

Die neue Präparationsmethode erzeugt quer über die Auftragsfläche der Analysesubstanz hinweg eine stets sehr gleichmäßige Ionisierungsstärke.

Diese Eigenschaften — Schicht mit glatter Oberfläche, feste Adsorption der Substanzmoleküle aus der Lösung, und eine gleichmäßige, extrem hohe Empfindlichkeit unabhängig vom Ort des Laserbeschusses — läßt einen so präparierten Probenträger zur idealen Unterlage für die Analyse der elektrophoretisch getrennten Proteine werden. Doch nicht nur das, gleichzeitig ist auch die Qualität der Spektren mit dieser Methode erheblich verbessert.

Das Massenauflösungsvermögen von Flugzeit-Spektrometern ist mit dieser Probenvorbereitung deutlich erhöht und entspricht dem Auflösungsvermögen, das von dem Spektrometer zu erwarten ist. Mit Flugzeit-Massenspektrometern, die mit energiefokussierenden Reflektoren ausgestattet sind, lassen sich Massenauflösungsvermögen von  $m/Am = 5000$  erreichen.

Die Genauigkeit der Massenbestimmung wird dadurch erhöht, daß die Massenskalen (Funktion der Abhängigkeit der Masse von der Flugzeit) nicht mehr — wie bei bisheriger Probenbereitungstechnik — für verschieden Substanzen eines Gemisches im selben Spektrum verschieden sind.

Die Genauigkeit der Massenbestimmung wird ferner dadurch erhöht, daß sich die Massen sehr genau gemäß der theoretischen Abhängigkeit der Masse von der Flugzeit inter- oder extrapolieren lassen. Es ist — im Rahmen der überhaupt erzielbaren Messengenauigkeit — keine Verzerrung der Massenskala mehr festzustellen. Die Probenträger mit der Matrixschicht können dabei sogar mit Referenzmaterialien zur Bestimmung der Masse vorbeladen sein. Diese "internen Referenzmaterialien" haben sehr genau bekannte Massen, aus denen sich leicht unbekannte Massen der später aufgetragenen Untersuchungssubstanzen ermitteln lassen. Bei der massenspektrometrischen Analyse erscheinen beide Materialien im selben Spektrum.

Die Trypsin-verdauten Proteinbruchstücke haben Molekulargewichte im Bereich von rund 500 bis 3000 atomaren Masseneinheiten. Ihr Molekulargewicht muß auf die Masseneinheit genau bestimmt werden. Durch

die oben angegebenen Verbesserungen der Methode sind alle Voraussetzungen für eine gute Proteinanalyse erfüllt. Es bleibt nur die Frage offen, wie die Proteine aus der Elektrophoreseplatte auf die Probenträgerplatte überführt werden können.

Es läßt sich diese Methode zur Ionisierung aber nicht nur für Flugzeit-Spektrometer benutzen, sie kann auch für speichernde Massenspektrometer, wie ICR-Spektrometer oder Ionenfallen, mit Erfolg verwendet werden.

Mit Ionenfallen-Massenspektrometern können beispielsweise die Aminosäuren-Sequenzen auch direkt bestimmt werden. Die Ionenfallen lassen sich so betreiben, daß nur eine einzige Ionensorte (Ionen einer Masse) eingespeichert wird, etwa ein bestimmtes Trypsin-Buchstück des originalen Proteins. Eine künstlich in der Ionenfalle herbeigeführte Fragmentierung dieses Buchstücks liefert dann Aminosäurenketten-Fragmente verschiedener Länge, aus denen sich nach bekannten Methoden die Sequenz bestimmen läßt. Durch Wiederholung des Verfahrens für die verschiedenen Trypsin-Buchstücke kann man die gesamte Sequenz bestimmen, wenn man die Sequenz der Trypsin-Buchstücke kennt. Diese läßt sich aber mit anderen Methoden feststellen, unter anderem auch wieder massenspektrometrisch.

Die Idee der MALDI-Analyse von elektrophoretisch separierten Proteinen ist nicht neu. So sind in jüngster Zeit zwei Arbeiten erschienen, die sich mit der MALDI-Ionisierung von Elektro-Blot-Membranen mit nachträglichem Auftrag der Matrixmaterialien beschäftigen.

K. Strupat, M. Karas, F. Hillenkamp, C. Eckerskorn und F. Lottspeich (Anal. Chem. 66, 464, (1994)) berichten über die Anwendung der MALDI-Ionisierung von Peptiden, die mit Elektrophorese von Gel-Platten auf PVDF-Membranen übertragen worden und nachträglich mit Matrixsubstanzen versehen worden waren. Die Laser-Desorption erfolgte direkt von der PVDF-Membran. Es wurden, mit verschiedenen Matrices, sowohl UV-Laserlicht (337 nm) wie auch infrarotes Licht (2,94  $\mu$ m) benutzt, wobei letzteres die besseren Ergebnisse brachte. Die Ionisierung von der PVDF-Membran hat jedoch erhebliche Nachteile. Es werden im unteren Massenbereich große Mengen an nicht als Linien aufgelöste Untergrundionen erzeugt, die das Spektrum kleiner Peptide überdecken.

M. Vestling und C. Fenselau (Anal. Chem. 66, 471 (1994)) berichten über ein praktisch gleiches Verfahren mit UV-Licht (337 nm), mit erstmalig durchgeführtem, zusätzlichem enzymatischen Abbau der Proteine durch Proteolyse in der PVDF-Membran. Durch bessere Probenpräparation, wahrscheinlich durch besseres Waschen, wurden hier bessere Spektren gewonnen. Diese Arbeit bietet auch eine gute Übersicht über den gegenwärtigen Stand der Technik.

Die erhaltenen Massenaufösungen sind in beiden Fällen bei weitem nicht so gut, wie sie mit Dünnschicht-Matrixfilmen erhalten werden, wenn von den Autoren auch "zufriedenstellende Genauigkeiten von 0,1%" für die Massenbestimmung angegeben wurden. Eine Genauigkeit von 0,1% reicht nicht aus, um im Massenbereich von 1000 bis 3000 atomaren Masseneinheiten die Molekularmasse zweifelsfrei zu bestimmen.

#### Aufgabe der Erfindung

Es ist ein Verfahren zu finden, mit dem separierte Proteine aus einer 2-D-Gel-Elektrophoreseplatte, unter

Erhalt ihrer örtlichen Verteilung, auf höchstempfindliche MALDI-Proben-trägerplatten überführt werden können. Dabei soll es möglich sein, eine enzymatische Spaltung der Proteine zwischenschalten.

#### Erfindungsgedanke und Erfindungserfolg

Basis der Erfindung ist die Erkenntnis, daß sich Proteine und andere Analysensubstanzen nachträglich auf Matrixschichten bestimmter Präparation aufbringen lassen. Sie können dann, entgegen der herrschenden Lehre, durch matrixunterstützte ionisierende Laser-Desorption ganz ausgezeichnet und mit hoher Empfindlichkeit ionisiert werden, mit Spektrenqualitäten, wie sie bisher nicht erreicht werden konnten. Bislang herrschte die Lehre, daß die Analysensubstanzen in Kristalle der Matrixsubstanz während der Auskristallisation eingebaut werden müßten, um durch Laser-Desorption ionisierbar zu werden.

Eine weitere Basis der Erfindung ist, daß sich auch mikroskopisch glatte Schichten aus der Matrixsubstanz so herstellen lassen, daß sie oberflächlich mit der Analysensubstanz beladen werden können, und zu einer höchstempfindlichen MALDI-Ionisierung fähig sind.

Eine weitere Basis der Erfindung ist es, daß sich die Analysensubstanzen aus Lösungen, deren Lösemittel die Matrixsubstanz praktisch nicht löst, von selbst fest an die Matrix binden. Die Oberfläche der in bestimmter Weise präparierten Schicht saugt somit durch Diffusion frei bewegliche Analysenmoleküle vollständig aus der Lösung. Die Moleküle der Analysensubstanz haften fest an der Matrixschicht, und lösen sich nicht wieder in der aufgetragenen Lösung.

Eine weitere Basis der Erfindung ist die Erkenntnis, daß dieser Prozeß der Bindung an die Matrixoberfläche nicht durch anwesende Puffersalze, nicht einmal durch schwache Säuren, behindert wird.

Eine weitere Basis ist die Erkenntnis, daß sich die Matrixschichten mit den aufgetragenen Proteinen nachträglich waschen lassen, ohne die Proteine zu verlieren. Damit können Salze, Elektrolyte und andere Beigaben der Proteinlösung von der Matrixschicht entfernt werden. Diese Waschungen sind außerordentlich wichtig, da mit ihnen die Qualität der erhaltenen Spektren steigt. Einige der Peptide erscheinen überhaupt nur nach dem Waschen, einige erscheinen ungewaschen nur als Kationen-Addukte, einige erscheinen als normal protonierte Ionen. Insgesamt ist das Auflösungsvermögen ohne Waschungen herabgesetzt. (Matrixschichten, die nach bisheriger Methode der Auskristallisation aus aufgetragenen Tröpfchen hergestellt wurden, halten Waschungen nicht stand; die kleinen Kriställchen werden dabei fortgespült.)

Die so auf die Matrixschicht aufgetragenen und gewaschenen Proteine ergeben Massenspektren von überragender Qualität. Sie sind bis zu einem Molekulargewichtsbereich von 3000 Dalton isotopenaufgelöst, das heißt, es lassen sich die Massensignale der einzelnen Massen des Isotopenmusters eines Moleküls voneinander trennen, und es können für die einzelnen Massen genaue Massenzahlen bestimmt werden. Die Genauigkeit der Massenbestimmung liegt bei 20 ppm.

Die Empfindlichkeit der Methode ist ebenfalls überragend. Von 50 Attomol eines Peptids oder Proteins lassen sich gut vermeßbare Spektren erzeugen.

Wird das feuchte Gel der Elektrophoreseplatte in direkten Kontakt mit der glatten Matrixschicht gebracht, so werden Substanzmoleküle, die durch Diffusion die

Matrixschicht erreichen, sofort an diese gebunden.

Leider sind die Moleküle aber in der Gelschicht nicht so frei beweglich, daß sie in beträchtlichem Maße diffundieren könnten. Es lassen sich daher ohne unterstützende Maßnahmen nur sehr geringe Mengen der Analysensubstanzen an die Matrixschicht bringen.

Etwas besser wirkt der direkte Kontakt mit einer Überträger-Membran, auf die die Proteine mit dem bekannten Verfahren des sogenannten "Elektro-Blotting", d. h. durch elektrophoretischen Transport, übertragen werden können. Aber auch hier sind die Protein-Moleküle auf der Überträger-Membran nicht frei beweglich, liegen allerdings an der Oberfläche in höherer Konzentration vor.

Der Zusatz bestimmter Chemikalien löst die Proteine vom Gel oder von der Überträger-Membran, macht sie besser frei beweglich und verbessert so die Anlagerung an die Matrixschicht. Für diesen Zweck kann beispielsweise Trifluor-Essigsäure in sehr verdünnter Form benutzt werden. Nachteilig ist aber hierbei, daß die Ortsauflösung der Separation hierdurch beträchtlich verschlechtert wird.

Es wird daher hier insbesondere vorgeschlagen, die Protein-Moleküle durch elektrophoretischen Transport zur Matrixschicht zu bringen, an der sie sich dann in vorbeschriebener Weise binden. Der Transport wird durch bestimmte Elektrolyte, wie schwache Lösungen von Tris-base und Borsäure, unterstützt. Die Technik ist in der Biochemie bereits weit verbreitet, und braucht dem Fachmann nicht näher erläutert werden.

Der elektrophoretische Transport verlangt einen minimalen Stromfluß, der in der Regel von den dünnen mikrokristallinen Matrixschichten ohne Schwierigkeiten durchgelassen wird. Einige Schichten bedürfen aber der künstlichen Erhöhung der Leitfähigkeit. Diese kann durch die Einlagerung von leitenden Substanzen bewirkt werden, wobei sowohl ionische Leiter (Salze) wie auch metallische Leiter (feinste Metallpulver) verwendet werden können.

Durch die Einschaltung eines Zwischenträgers, etwa einer PVDF-Membran, lassen sich die Proteinketten auch in bekannter Weise durch Enzyme ortsfest in der Membran spalten (Proteolyse). Auch diese Technik ist dem biochemischen Fachmann bekannt.

Für alle diese Techniken ist das anschließende Waschen des matrixbeladenen Proben-trägers von großer Bedeutung. Es können die für die elektrophoretische Trennung im Gel benötigten Salze, und die für den elektrophoretischen Transport zur Blot-Membran oder zur Matrixschicht benötigten Elektrolyte (beispielsweise Borsäure) nach dem Übertragen auf die Matrixschicht wieder abgewaschen werden, um Spektren mit der oben geschilderten überragenden Qualität zu erhalten.

#### Wirtschaftliche Bedeutung

Das Verfahren wird insbesondere in der Medizin größere gesundheitliche und wirtschaftliche Bedeutung erlangen. Es ist mit der Kombination Gel-Elektrophorese und MALDI-MS sehr schnell möglich, fehlgebildete Eiweiße aus den Zellen bestimmter Organe oder bestimmter Körperflüssigkeiten zu finden, und die Art der Fehlbildung zu bestimmen. Diese fehlgebildeten Eiweiße erscheinen auf der Gel-Elektrophoreseplatte (nach Anfärben oder anderen Methoden der Sichtbarmachung) an anderen als ihren angestammten Plätzen, und können so sehr leicht, beispielsweise mit bereits existierenden Computerprogrammen, herausgefunden wer-

den. Mit der hier vorgestellten Methode ist es dann sehr schnell möglich, die Art der Fehlbildung des Eiweißes zu bestimmen.

#### Besonders günstige Ausführungsformen

Eine Lösung von  $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure in Aceton verteilt sich beim Aufpipettieren auf einen sauberen, metallischen Träger praktisch augenblicklich, da ihre Oberflächenspannung verschwindend klein ist. Ein Mikroliter einer fast gesättigten Lösung genügt für etwa 4 Quadratzentimeter Oberfläche, woraus sich eine Dicke des Lösungsfilms von etwa 2,5 Mikrometer, und eine Dicke der Matrixschicht nach dem Eintrocknen von etwa 300 bis 600 Nanometer ergibt. Diese Dicke hat sich als sehr günstig erwiesen.

Verdunstet man das Lösungsmittel unter einem sauberen Luftstrom in weniger als 10 Sekunden, so erhält man eine dünne, optisch glatte, lackartige Schicht der Matrix.

Das Matrixmaterial  $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure, das in Aceton besonders gut löslich ist, jedoch kaum in reinem Wasser oder in angesäuerten Methanol-Wassergemischen, hat sich für Proteinanalysen besonders bewährt. Es können jedoch auch andere, dem Fachmann bekannte Matrixmaterialien oder Lösemittel mit ähnlichem Erfolg verwendet werden.

Die so hergestellten Proben-träger mit dünner Matrixschicht binden Protein- und andere schwere Moleküle aus Lösungen so fest, daß sie in anschließenden Waschungen mit leicht angesäuertem Wasser, aber auch anderen Waschflüssigkeiten, nicht mehr beseitigt werden können. Die Waschungen beseitigen störende Begleit-substanzen, wie Puffersalze, Elektrolyte und andere Residuen der Lösung.

Es ist günstig, die vorzugsweise metallischen Proben-träger vor oder nach dem Belegen mit der Matrixschicht mit einem elektrisch nicht leitfähigen Lackrand zu versehen. Dieser Rand erleichtert die spätere elektrophoretische Übertragung von Proteinen, da ein Kurzschluß mit dem metallischen Träger am Rande vermieden wird.

Die Proben-träger können nun mit der glatten Matrixschicht fest auf die feuchte Gelplatte oder feuchte Übertragungs-membran gedrückt, und dort einige Minuten gehalten werden. Dieser Prozeß alleine genügt bereits, um Spektren zu erhalten. Es werden dabei pro separiertem Protein, und abhängig von der Ausgangskonzentration, etwa 5 bis 200 Attomol Substanz übertragen, wobei etwa 50 Attomol für ein relativ gutes Spektrum ausreichen.

Das Versetzen der Membranen mit einer sehr verdünnten Lösung von Trifluor-Essigsäure, die anschließend von der Matrixschicht wieder gut abgewaschen wird, erhöht die Ausbeute leicht.

Am günstigsten ist jedoch ein elektrophoretischer Transport der Proteine zu der Matrixschicht. Mit elektrophoretischem Transport können leicht Femtomol-Mengen übertragen werden. Da eine Überladung der Matrixschicht mit Proteinen dem Ionisierungsprozeß schadet, kann man das Beladen der Matrixschicht mehrmals wiederholen, ohne eine zu starke Abnahme der Konzentration in der Ausgangsmembran zu bemerken. Es können verschiedene Proben-trägerplatten mit Proteinen aus einer einzigen Gel-Separation belegt werden, entweder von verschiedenen Stellen der Gel-Platte, oder auch von derselben Stelle, da die Proteinmenge größer ist als für die Proben-trägerplatte benötigt.

Bei Verwendung der Übertragungs-membran können

die Proteine in an sich bekannter Weise in situ durch Enzyme zerschnitten ("verdaut") werden. Dieser Vorgang wird Proteolyse genannt. Anschließend wird dann das Gemisch der Bruchstücke elektrophoretisch auf die Matrixschicht übertragen. Auch hier genügen etwa 50 bis 100 Attomol pro Bruchstück, also auch nur 50 bis 100 Attomol des Ausgangs-proteins, für ausreichend gute Spektren, die das Molekulargewicht der Bruchstücke auf besser als eine atomare Masseneinheit ergeben.

Insbesondere kann man wegen der hohen massenspektrometrischen Empfindlichkeit mehrere Proben-trägerplatten von einer Gel-Separation aus beladen. Es ist dabei möglich, einige Proben-träger mit den unzerschnittenen, originalen Proteinen zu beladen, und weitere Proben-träger anschließend mit enzymatisch verdauten Proteinen. Es lassen sich damit sowohl die Molekulargewichte der originalen Proteine wie auch die Identität der Proteine durch die Enzym-Bruchstücke bestimmen.

Für die Spektrenaufnahme kann besonders günstig ein defokussierter Laserstrahl benutzt werden. Es lassen sich von einer Auftragung mit 50 Attomol Analysensubstanz in aufeinanderfolgenden Laserschüssen etwa 30 bis 300 Spektren erzeugen, die gewöhnlich auffaddiert werden, um das Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu verbessern. Bei einer Wiederhol-frequenz des Lasers von 10 Hz dauert die gesamte Spektrenaufnahme für eine Substanz nur drei bis dreißig Sekunden. Bei höheren Konzentrationen lassen sich wesentlich kürzere Aufnahmezeiten erzielen.

Insbesondere kann man durch Verschieben des Laser-Punktes (oder durch Bewegen der Proben-trägerplatte) die Oberfläche des Proben-trägers mit dem Massenspektrometer abtasten. Die einzelnen, räumlich verteilten Proteine lassen sich dann durch ihre Spektren erkennen. Bei überlappenden Protein-flecken können mathematische Trennmethoden für die "Dekonvolution" der Spektren angewandt werden, wie sie schon für GC/MS-Techniken entwickelt worden sind.

Zweckmäßigerweise ist die Matrixschicht bereits vorher mit Referenzsubstanzen bekannter Molekularmasse belegt, um durch diese interne Referenz zu sehr genauen Molekulargewichtsbestimmungen zu kommen. Es konnte bereits mit so belegten Matrixschichten Massengenauigkeiten von etwa 20 ppm erreicht werden.

Eine oder auch mehrere Referenzsubstanzen mit bekannten Molekulargewichten können sehr einfach vor dem Aufbringen der Proben großflächig in sehr geringer Menge aufgebracht werden. Es ist auch möglich, die Referenzsubstanzen bereits der Matrixlösung beizugeben.

Die Proben-träger lassen sich mit Matrixschichten und Referenzsubstanzen über viele Wochen aufheben. Guter Luftabschluß ist ratsam, da sich die sehr adsorptions-aktiven Schichten relativ rasch mit Substanzen aus der Umgebungsluft anreichern. Eine Kühlung der Träger ist ebenfalls empfehlenswert, weil noch nicht bekannt ist, ob sich die mikrokristalline Schicht im Laufe der Zeit zu größeren Kristallen umkristallisiert.

#### Patentansprüche

1. Verfahren zur massenspektrometrischen Analyse von Substanzproben, die mit ein- oder zweidimensionalen Gel-Elektrophorese auf Gel-Elektrophoreseplatten separiert wurden, mit einer Ionisierung der Substanzproben nach ihrer Überführung auf Proben-trägerplatten durch matrix-unterstützte ionisierende Laser-Desorption (MALDI), dadurch

gekennzeichnet, daß die Probenträgerplatten mit einer optisch glatten, adsorptiven Schicht einer festen Matrixsubstanz überzogen sind, und daß die Substanzproben durch direkten Kontakt mit der feuchten Elektrophoreseplatte, oder, bei Benutzung einer Überträger-Membran durch Kontakt mit der feuchten Überträger-Membran, auf die Oberfläche der Matrixschicht der Probenträgerplatte übertragen werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Übertragung auf die Probenträgerplatte von ausgeschnittenen Stücken der Gel-Elektrophoreseplatte oder der Überträger-Membran, die ausgewählte Substanzproben enthalten, aus erfolgt.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Übertragung der Substanzproben ohne Zerschneiden der Membranen großflächig unter Erhaltung ihrer 2-dimensionalen Verteilung geschieht.

4. Verfahren nach Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Übertragung der Probensubstanzen durch die Zugabe von Chemikalien, beispielsweise verdünnter Trifluor-Essigsäure, erleichtert wird.

5. Verfahren nach Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Substanzproben von der Elektrophoreseplatte oder der Überträger-Membran elektrophoretisch zur Probenträgerplatte übertragen werden.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1, 2, 3 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Substanzproben von der Elektrophoreseplatte zunächst in an sich bekannter Weise elektrophoretisch auf eine Übertragungsmembran übertragen werden ("Elektro-Blotting"), und daß in einem zweiten Schritt die Substanzproben von der Übertragungsmembran zur Matrixschicht auf der Probenträgerplatte elektrophoretisch übertragen werden.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Übertragungsmembran aus PVDF (Polyvinylidendifluorid) besteht.

8. Verfahren nach einem der bisherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Substanzproben um Proteine im weitesten Sinne handelt.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Aminosäureketten der Proteine in einem Zwischenschritt enzymatisch zerschnitten werden.

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Zerschneiden in der Gel-Elektrophoreseplatte erfolgt.

11. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Zerschneiden der Proteine in der Übertragungsmembran stattfindet.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 9, 10, oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß das enzymatische Zerschneiden durch Trypsin geschieht.

13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Übertragung von Proteinen aus einer Gel-Separation portionenweise nacheinander auf mehrere Probenträgerplatten erfolgt.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß nach einer oder mehreren Übertragungen von unzerschnittenen Proteinen auf Probenträgerplatten eine enzymatische Zerschneidung

der zurückgebliebenen Portionen der Proteine stattfindet, und anschließend die proteolytischen Bruchstücke der Proteine einmal oder mehrmals auf Trägerplatten übertragen werden.

15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Oberfläche der Probenträgerplatten durch fortlaufende Spektrennahmen an verschiedenen Stellen ein- oder zweidimensional abgetastet wird.

16. Verfahren nach einem der bisherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Matrixschicht der Probenträgerplatte durch Einlagerung von Ionen- oder elektronenleitenden Substanzen leitend gemacht wird.



cited in ISR

31

1

**FEDERAL REPUBLIC OF GERMANY  
GERMAN PATENT OFFICE**

Int. Cl.<sup>6</sup>:  
**G 01 N 27/453**  
**G 01 N 27/62**  
**H 01 J 49/02**  
**C 07 K 1/26**

**Patent Specification  
DE 44 08 034 C1**

File number: P 44 08 034.4-52  
Date of application: March 10, 1994  
Laying open to public inspection:  
Publication of the patent award: July 13, 1995

Oppositions can be raised within 3 months after publication of the award

Patent owner:  
Bruker-Franzen Analytik GmbH, 28359 Bremen, Germany

Inventor:  
Franzen, Jochen, 28359 Bremen, Germany

Documents considered for judging patentability:

Analytical Chemistry, Vol. 66 (1994), p. 464 ff;  
Analytical Chemistry, Vol. 66 (1994), p. 471 ff;

**A Method for the Mass-Spectrometric Analysis of Samples from 2-D-Gel  
Electrophoresis Plates with Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization**

The method relates to the mass-spectrometric analysis of separated substance samples on so-called 2-D-gel electrophoresis plates, such as are used especially to determine proteins, with ionization of the substance samples by matrix-assisted laser desorption/ionization (= MALD or MALDI). The molecules of the

substance samples are transferred to a thin, lacquer-like, smooth matrix layer, which is applied to a preferably metallic sample support. The molecules are transferred directly or indirectly, for example through a PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane as an intermediate carrier, by electrophoretic transport. Before transfer, the proteins can be subjected to enzymatic cleaving of their amino acid chains.



## **Description**

### **Background of the Invention**

The method relates to the mass-spectrometric analysis of separated substance samples on so-called 2-D-gel electrophoresis plates, such as are used especially to determine proteins, with ionization of the substance samples by matrix-assisted laser desorption/ionization (= MALD or MALDI). The molecules of the substance samples are transferred to a thin, lacquer-like, smooth matrix layer, which is applied to a preferably metallic sample support. The molecules are transferred directly or indirectly, for example through a PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane as an intermediate carrier, by electrophoretic transport. Before transfer, the proteins can be subjected to enzymatic cleaving of their amino acid chains.

### **Prior Art**

Two-dimensional electrophoresis constitutes one of the fastest and neatest methods of separating hundreds of proteins simultaneously from biological protein mixtures and also offers an approximate classification. In the monthly journal "Electrophoresis" (published by Verlag Chemie, Weinheim), in annual special November issues, thousands of human and animal proteins which have been separated and approximately classified are compiled in databases. An approximate determination of the molecular weight of the proteins due to the electrophoretic properties is performed which, however, may be incorrect by a factor of 2 on account of unknown form factors. The molecular weights range from 8 to about 160 kilodalton.

Of the 3038 skin proteins published in November 1993, 763 were more closely identified, and of 176 proteins only parts of the amino acid sequence were known. The same is true, in principle, for the databases previously published. In total it can be estimated that the number of human proteins is between 50,000 and 100,000, just as many as there are estimated human genes.

It has long been desirable to determine the proteins more accurately. In particular, the "Human Genome Project" would run idle if it were not possible to

determine the proteins generated by the DNA chains accurately. Determination should not relate only to the exact molecular weight but preferably also to the determination of the complete amino acid sequence irrespective of DNA sequence analyses.

An intermediate step is to determine whether the protein is an already-known protein. This step is now easy to do, since 30,000 to 40,000 proteins, with their amino acid sequences, are now contained in databases, and thus are known either partly or wholly. Furthermore, more than 100,000 proteins are stored there, whose amino acid sequences were obtained computationally from DNA sequence data. However, the existence or the correct structure of these proteins is still unknown.

One example is the database of the European Molecular-Biological Laboratory in Heidelberg (EMBL), which is available on a CD-ROM.

These databases sometimes are computationally developed so that they also contain the fragments expected under enzymatic digestion, for example the fragments that are formed by applying trypsin. Trypsin always cleaves the amino acid chains at characteristic sites between two particular amino acids.

The mixture of these trypsin fragments is extraordinarily characteristic of a protein. A protein already can be identified with great certainty from knowing the molecular weights of a few fragments. It takes  $10^{13}$  proteins to find two different ones which have in common five different trypsin fragments with exactly the same molecular weights. With more than five known fragments, the certainty of the determination rises exponentially.

Digestion of an unknown protein with the enzyme trypsin, and subsequent measurement of the molecular weights of the fragments, therefore makes it possible to check very quickly and with great certainty in the database whether the protein is already included there.

Molecular weights can be measured very quickly and easily by mass spectrometry. The method of matrix-assisted laser desorption/ionization now allows simultaneous, very effective ionization of peptides and proteins in

mixtures. The ions can be measured by time of flight spectrometers, by ion trap or ICR mass spectrometers.

Ionizing laser desorption of large, organic molecules can be assisted by light-absorbing substance matrices, generally organic acids or other, not too large, polar organic molecules. This has already become a widely used standard technique. It is preferably used for time of flight mass spectrometry, but is also suited for ion-storing mass spectrometers, such as ICR or ion traps.

Bombardment with a pulsed laser creates a cloud of vapor by heating a small volume of the matrix substance. Because the molecules can be easily ionized and because the vaporization temperature is relatively high, this cloud, according to the Saha-Eggert equation, must contain a small portion of ionized molecules. It therefore is a weak plasma. The large molecules, in our case proteins, which are included in the matrix material, are thus co-vaporized without being damaged. The ion-molecule reactions in this plasma then preferably ionize the heavy molecules, since their ionization is energetically more favorable.

MALDI is particularly favorable for time-of-flight mass spectrometers because the ions of the large molecules are created in a very short time interval, and because time-of-flight spectrometers are particularly suitable for the examination of large molecules. Usually lasers with a pulse length of approximately 5 ns are used.

The method has hitherto required layers with a very irregular surface with some larger matrix crystals, within which the substance under investigation had to be embedded. However, a new method, described in the Patent Application BFA 1/94, has made it possible to use a uniformly thick, smooth, lacquer-like matrix layer, whose thickness is two to three wavelengths of the utilized laser light, and which makes it possible to apply the analyte substances to the surface of the matrix layer only after creation of this layer.

Loading this matrix layer with substance molecules is very simple. For example, a very dilute solution can be pipetted in simply as solution droplets. The substance molecules are bound solidly to the matrix surface in a short time. This type of bonding is not yet known; it may involve surface adsorption, absorption in the top layers of the matrix, or also penetration of the surface into interstitial

regions. In any case, the bonding is so strong that the substance molecules cannot be removed during subsequent washings of the surface.

This new preparation method greatly improves the substance yield. If only 50 attomols of a protein are applied to a spot about 2 mm in diameter, one can already obtain satisfactory analyzable spectra. This reduces the consumption of substance by a factor of 1000, compared to the previously customary method.

The new preparation method always creates a very uniform ionization strength across the application surface of the analyte substance.

These properties - a layer with a smooth surface, permanent adsorption of the substance molecules from the solution, and a uniform, extremely high sensitivity independent of the site of the laser bombardment - makes a sample support prepared in this way an ideal substrate for analyzing the electrophoretically separated proteins. But not only this - at the same time the quality of the spectra is greatly improved by this method.

This method of preparing the samples greatly improves the mass resolving power of time or flight spectrometers. The resolution corresponds to that which can be expected from the spectrometer. Time of flight mass spectrometers, which are equipped with energy-focusing reflectors, can achieve mass resolutions of  $m/\Delta m = 5000$ .

The accuracy of the mass determination is increased in that the mass scales (function of the dependence of the mass on the time of flight) are no longer different for different substances of a mixture in the same spectrum - as is the case with the previous sample preparation technique.

The accuracy of the mass determination is further increased in that the masses can be very accurately interpolated or extrapolated according to the theoretical dependence of the mass on the time of flight. Within the bounds of the mass accuracy that is at all achievable, distortions of the mass scale can no longer be observed. The sample supports with the matrix layer can even be pre-loaded with reference materials to determine the mass. These "internal reference materials" have very accurately known masses, from which the unknown masses

of the subsequently applied analyte substances can be very easily determined. In the mass-spectrometric analysis, both materials appear in the same spectrum.

The trypsin-digested protein fragments have molecular weights in the range of about 500 to 3000 atomic mass units. Their molecular weight must be determined accurately down to the mass unit. The improvements of the method specified above provide all the prerequisites for a good protein analysis. The only remaining question is how the proteins can be transferred from the electrophoresis plate to the sample support plate.

This method for ionization cannot only be successfully used for time of flight spectrometers but also for storing mass spectrometers, such as ICR spectrometers or ion traps.

For example, with ion trap mass spectrometers the amino acid sequences can also be determined directly. The ion traps can be operated in such a way that only a single ion type (ions of one mass) are stored, for example a particular trypsin fragment of the original protein. If this fragment is then artificially fragmented in the ion trap, it will yield amino acid chain fragments of various length, from which the sequence can be determined by known methods. By repeating this method for the various trypsin fragments, the entire sequence can be determined if the sequence of the trypsin fragments is known. However, this can be determined by other methods, among others again mass spectrometry.

The idea of subjecting electrophoretically separated proteins to MALDI analysis is not new. In fact, recently two papers were published which deal with MALDI ionization of electro-blot membranes with subsequent application of the matrix materials.

K. Strupat, M. Karas, F. Hillenkamp, C. Eckershorn, and F. Lottspeich (Anal. Chem. 66, 464, (1994) report the use of the MALDI ionization technique in the analysis of peptides which had been transferred from gel plates to PVDF membranes by electrophoresis and subsequently coated with matrix substances. Laser desorption took place from the PVDF membrane direct. With various matrices both UV laser light (337 nm) and infrared light (2.94  $\mu$ m) were used, the

latter producing better results. However, ionization from the PVDF membrane had considerable drawbacks. In the lower mass range, large quantities of background ions appeared not resolved as lines, covering the spectrum of small peptides.

M. Vestling and C. Fenselau (Anal. Chem. 66, 471 (1994)) report a practically identical method with UV light (337 nm), with additional enzymatic breakdown of the proteins by proteolysis in the PVDF membrane. Due to better sample preparation, probably as a result of improved washing, better spectra were obtained. This work also offers a good overview of the current state of the art.

In both cases the mass resolutions obtained are by no means as good as obtained with thin layer matrix films even if the authors report "satisfactory levels of accuracy of 0.1%" for the mass determination. An accuracy of 0.1% is not sufficient to determine the molecular mass in the mass range from 1000 to 3000 atomic units of mass with absolute certainty.

### **Object of the Invention**

It is the object of the invention to find a method by which proteins, which are separated from a 2-D-gel electrophoresis plate while maintaining their spatial distribution, can be transferred to highly sensitive MALDI sample support plates. It should also be possible to cleave the proteins enzymatically in between.

### **Idea and Success of the Invention**

The invention is based on the idea that proteins and other analyte substances can subsequently be applied to matrix layers that have been prepared in a certain way. Contrary to the prevailing teaching, they can then be excellently ionized with high sensitivity by matrix-assisted laser desorption/ionization, yielding spectra of a quality such as previously could not be attained. The prevailing teaching has been that the analyte substances must be built into crystals of the matrix substance during the crystallization process, in order to make them ionizable by laser desorption.

Another basis of the invention is that microscopically smooth layers can also be produced from the matrix substance such that their surface can be loaded with the analyte substance and such that they are capable of extremely sensitive MALDI ionization.

Another basis of the invention is that the analyte substances from solutions, whose solvent practically does not dissolve the matrix substance, by themselves solidly bind to the matrix. The surface of a layer which has been prepared in a certain way thus suctions the freely mobile analyte molecules completely from the solution by diffusion. The molecules of the analyte substance adhere solidly to the matrix layer, and no longer dissolve in the applied solution.

Another basis of the invention is the idea that this process of binding to the matrix surface is not hindered by buffer salts which may be present, not even by weak acids.

Another basis is the idea that the matrix layers with their applied proteins subsequently can be washed without losing the proteins. Salts, electrolytes, and other additives of the protein solution thus can be removed from the matrix layer. These washings are extremely important, since they improve the quality of the resulting spectra. Some of the peptides do not appear at all except after washing, some appear unwashed only as cation adducts, some appear as normally protonated ions. Without washing, resolution is altogether reduced. (Matrix layers which have been produced by crystallization of the applied droplets, according to the previous method, cannot withstand washing; the small crystals are flushed away.)

The proteins applied to the matrix layer and washed in this way yield mass spectra of outstanding quality. Isotopes are resolved up to a molecular weight range of 3000 dalton, that is the mass signals of the individual masses of the isotope pattern of a molecule can be separated from one another, and exact mass numbers can be determined for the individual masses. The accuracy of the mass determination is about 20 ppm.

The sensitivity of the method is also outstanding. Readily measurable spectra can be created from 50 attomol of a peptide or protein.



If the moist gel of the electrophoresis plate is brought into direct contact with the smooth matrix layer, substance molecules which reach the matrix layer by diffusion are immediately bound to it.

Unfortunately, molecules in the layer are not sufficiently mobile to diffuse to any considerable extent. Consequently, without supportive measures, only very small quantities of analyte substance can be brought into the matrix layer.

To make the method more effective, the analyte is transferred to the matrix by direct contact with a transfer membrane, to which the proteins can be transferred by the familiar method of so-called "electro-blotting," i.e. by electrophoretic transport. However, in this method, too, the protein molecules on the transfer membrane are not freely mobile, although their concentration at the surface is higher.

Adding certain chemicals detaches the proteins from the gel or from the transfer membrane, makes them more mobile, and thus improves their deposition on the matrix layer. For example, trifluoro-acetic acid in very dilute form can be used for this purpose. However, this has the advantage of considerably impairing the spatial resolution of the separation.

It is therefore especially proposed to use electrophoretic transport to bring the protein molecules to the matrix layer, at which they are bound in the manner described above. The transport may be enhanced by certain electrolytes such as weak solutions of tris-base or boric acid. The technique is already widespread in biochemistry and does not need to be explained in detail to a person skilled in the art.

Electrophoretic transport calls for a minimal flow of current, which the thin microcrystalline matrix layers usually permit. Some layers require an artificial increase in conductivity. This can be caused by inlaying conductive substances, for example ionic conductors (salts) and metallic conductors (very fine metal powders).

By utilizing an intermediate support such as a PVDF membrane, the protein chains can also be cleaved by enzymes in a conventional manner by proteolysis. Again, this technique is known to a person skilled in biochemistry.

In all these techniques the washing of the matrix-loaded sample support is of great importance. The salts utilized for electrophoretic separation in the gel and the electrolytes required for the electrophoretic transport to the blot membrane or to the matrix layer (for example boric acid) have to be washed off again in order to obtain spectra of the aforementioned excellent quality.

### **Economic Importance**

The method is significant in the field of medicine, both from the point of view of health and of economics. By utilizing the combination of gel electrophoresis and MALDI MS malformed proteins can be very quickly found in the cells of certain organs or certain body fluids and the type of malformation can be very quickly established. These malformed proteins appear on the gel electrophoresis plate (after staining or using other methods of visualization) at places other than their usual ones so they can be very easily found, with computer programs already available. With the method presented here it is then possible to very quickly determine the type of protein malformations.

### **Especially Beneficial Embodiments**

A solution of  $\gamma$ -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid in acetone was transferred to a clean metallic support by pipette and dispersed almost instantaneously because its surface tension is vanishingly low. One microliter of a virtually saturated solution was sufficient for about 4 square centimeters of surface, resulting in a solution film thickness of about 2.5  $\mu$ m and a matrix layer thickness of about 300 to 600 nm after drying. This thickness has proved very favorable.

The solvent was evaporated in a clean current of air in less than 10 s, and the matrix layer obtained was thin, visually smooth, and lacquer-like.

The matrix material  $\gamma$ -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid, which is highly soluble in acetone but barely soluble in pure water or in acidified methanol-water solution, has proved particularly advantageous for protein analyses. However, other matrix materials or solvents known to the expert can also be used with similar success.

The sample supports made in this way and having a thin matrix layer bind protein and other heavy molecules from solutions so firmly that they cannot be removed in subsequent washing processes with mildly acidified water or other washing liquids. The washing processes eliminate substances such as buffer salts, electrolytes, and other residues in the solution which interfere with the determination.

It is desirable to provide the preferably metallic sample supports with a non-electrically conductive lacquer border either before or after coating with the matrix layer. This border facilitates subsequent electrophoretic transfer of proteins because a short circuit with the metallic support at the border can be prevented.

The sample support with the smooth matrix layer can now be firmly pressed onto the moist gel plate or moist transfer membrane and kept there for a few minutes. This process on its own is sufficient to obtain spectra. About 5 to 200 attomol of substance are transferred per separated protein, depending on the original concentration. About 50 attomol is adequate for a relatively good scan.

Adding a highly diluted solution of trifluoro-acetic acid to the membranes increases yield slightly. The trifluoro-acetic acid subsequently is again washed out from the matrix layer.

However, the most favorable method is for the proteins to be transported to the matrix layer by electrophoresis. By electrophoretic transport femtomol quantities can easily be transferred. Since overloading the matrix layer with proteins detracts from the ionization process, the loading of the matrix layer can be repeated a number of times without causing an excessive reduction of concentration in the original membrane. Various sample support plates can be

coated with proteins from a single gel separation either from different points on the gel plate or also from the same point because the quantity of protein is greater than required for the sample support plate.

When using the transfer membrane the proteins were cleaved ("digested") by enzymes in situ in a manner which is basically known. This process is called proteolysis. Subsequently, the mixture of fragments was transferred to the matrix layer electrophoretically. Here, too, about 50 to 100 attomol per fragment was sufficient, i.e. only 50 to 100 attomol of the original protein, to obtain spectra of adequate quality which allow determination of the molecular weight of the fragments to better than one atomic unit of mass.

In particular, several sample support plates can be loaded from a single gel separation on account of the high sensitivity of mass spectrometry. In doing so it is possible to load some sample supports with the uncut, original proteins and then other sample supports with enzymatically digested proteins. In this way, both the molecular weights of the original proteins and the identity of the proteins can be determined by means of the enzyme fragments.

For recording the spectra it is particularly advantageous to use a defocused laser beam. From an application of 50 attomol of analysis substance it is possible to produce about 30 to 300 spectra in consecutive laser bombardments, which are usually added together in order to enhance the signal-to-noise ratio. At a laser repetition frequency of 10 Hz, the entire scan takes only 3 to 30 s per substance. At higher concentrations much shorter scanning times can be achieved.

In particular, the surface of the sample support can be scanned with the mass spectrometer by moving the laser point (or by moving the sample support plate). The individual spatially distributed proteins were then recognized by their scans. Where spots of protein overlap, mathematical methods of separation can be used to "deconvolute" the scans as already developed for GC/MS techniques.

It is advisable to coat the matrix layer with reference substances of known molecular mass beforehand in order to obtain very accurate molecular weight determinations through this internal reference. With matrix layers coated in this way, it is possible to achieve mass accuracies of about 20 ppm.

Very small quantities of one or more reference substances with known molecular weights can very easily be applied over large areas before the samples are applied. It is even possible to add the reference substances to the matrix solution.

The sample supports can be stored with matrix layers and reference substances for many weeks. There should be efficient exclusion of air because the highly adsorbent layers relatively quickly accumulate substances from the ambient air. It is also advisable to cool the supports because it is not known whether the microcrystalline layer recrystallizes in the course of time to form larger crystals.

#### Claims

1. A method for the mass-spectrometric analysis of substance samples which were separated by one- or two-dimensional gel electrophoresis on gel electrophoresis plates by matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI), characterized in that the sample support plates are covered by an optically smooth, adsorptive layer of a solid matrix substance, and that the substance samples are transferred to the surface of the matrix layer of the sample support plate by direct contact with the moist electrophoresis plate or, when using a transfer membrane, by contact with the moist transfer membrane.
2. The method of Claim 1, characterized in that pieces cleaved from the gel electrophoresis plate or from the transfer membrane, which contain selected substance samples, are transferred to the sample support plate.
3. The method of Claim 1, characterized in that the substance samples are transferred without cutting the membranes, as a large area, while preserving their two-dimensional distribution.
4. The method of Claims 1 to 3, characterized in that the addition of chemicals, for example dilute trifluoro-acetic acid, facilitates the transfer of the sample substances.

5. The method of one of the Claims 1 to 3, characterized in that the substances are transferred electrophoretically from the electrophoresis plate or from the transfer membrane to the sample support plate.
6. The method of one of the Claims 1, 2, 3, or 5, characterized in that the substance samples are first transferred electrophoretically from the electrophoresis plate to a transfer membrane in well-known fashion ("electro-blotting"), and that, in a second step, the substance samples are transferred electrophoretically from the transfer membrane to the matrix layer on the sample support plate.
7. The method of Claim 6, characterized in that the transfer membrane consists of PVDF (polyvinylidene difluoride).
8. The method of one of the preceding claims, characterized in that the substance samples are proteins in the broadest sense.
9. The method of Claim 8, characterized in that the amino acid chains of the proteins are enzymatically cleaved in an intermediate step.
10. The method of Claim 9, characterized in that the cleavage takes place in the gel electrophoresis plate.
11. The method of Claim 9, characterized in that the cleavage of the proteins takes place in the transfer membrane.
12. The method of one of the Claims 9, 10, or 11, characterized in that the enzymatic cleavage is effected by trypsin.
13. The method of one of the preceding claims, characterized in that the proteins are transferred successively by portions, from a gel separation to several sample support plates.
14. The method of Claim 13, characterized in that, after one or more transfers of uncleaved proteins to sample support plates, the remaining portions of the proteins are enzymatically cleaved, and subsequently the proteolytic

fragments of the proteins are transferred once or several times to support plates.

15. The method of one of the preceding claims, characterized in that the surface of the sample support plates are scanned one- or two-dimensionally at various points by continuous spectral recordings.
16. The method of one of the preceding claims, characterized in that the matrix layer of the sample support plate is made conducting by inserting ionically or electronically conducting substances.